

生物教材研究—身近な水生動物の簡単な呼吸量測定法

A simple method for measuring the respiration rates in aquatic small animals

岩田 勝哉, 溝口 和子, 広瀬 正紀, 宮永 健史, 宮本 典子

高等学校の理科などでは「探求学習」や「課題研究」などが導入されることとなり、生徒が自主的に行う観察・実験教材の開発が必要となってきた。本小論では、「探求学習」や自由研究などにおいて、高価な器具を使わずに誰もが比較的簡単に測定できる水生の小動物の呼吸量の測定法について記す。

キーワード：代謝量，酸素消費量，呼吸量，水中酸素濃度，水生動物

1. はじめに

どのような動物も生きるために、刻々とエネルギーを消費していることを生徒に実感させることは生命の実体や生命の大切さを理解させる上で極めて大切である。小動物に興味を示す場合でも、ともすればその関心は一時的であり、その動物が自分自身と同様に呼吸し、エネルギーを消費しているとの理解には至らない場合が多い。

動物の呼吸量の測定法としては、昆虫などの空気呼吸を行う動物の測定法は装置が簡単なことと関連して、教科書などにも記載されている。しかし、あり合わせの簡便な装置を用いて、この種の測定を実際に行ってみると、様々なファクターをクリアーしないとうまく行かないことが多い。これに対し水中呼吸では、酸素濃度を求めるのが面倒な反面、非常に簡単な装置で失敗なく呼吸量を求めることができるという利点がある。

動物の呼吸量の測定結果をどのように教材として活用するかは取り扱う主題や動物の種類によってさまざまであろうが、ここでは、測定値を基に代謝速度と動物のサイズ（体重）との間の関係を求める例について述べることにする。

水中の呼吸量を測定するには水中の酸素濃度（溶存酸素量）の測定が必要である。最近では非常に簡便な酸素濃度計が市販されているので、それらを利用するのが最もてっとり早い方法であるが、酸素濃度計は簡単なものでも20万円程度するので、ここではウィンクラー法を用いた測定法について述べることにする。ただし、ウィンクラー法の詳細は水質分析法などの書物に書かれているので^{1),2)}、ここでは測定の概略について記するに止める。また、ウィンクラー法では、水酸化ナトリウムや塩酸などいわゆる劇薬を使用することとなるが、教師がこれらの安全な使用法を工夫する（薬品が容易に倒れないようにするなど）ことや使用に際しての注意を徹底させることで危険性を克服できる。しかも、この方法は、色の濃さから酸素濃度の高低を直感できたり、酸化還元やヨウ素デンプン反応など、測定のプロセス自体に興味深い教材を含んでいるほか、植物プランクトンの生産量（光合成量）の測定などにも応用できる。

2, 用語の解説

単位時間内に動物が消費したエネルギーや物質量を代謝量（速度）あるいは代謝率と呼ぶ。ただし、代謝量は1個体の単位時間あたりの消費速度を指し、代謝率は単位体重および単位時間あたりの速度を意味する場合が多い。また、代謝量（率）は一般にエネルギー消費量を意味し、他の物質の場合は窒素代謝量のように特定の物質名をつけて呼ばれる。動物の代謝量は標準代謝量と運動代謝量に分けられる。前者は動物を小さな容器に入れて運動を制限した場合の代謝量（静止時の代謝）であり、後者は運動時の代謝量である。これらの代謝量の測定は通常、動物の酸素消費量から求めることが多いので、呼吸量と代謝量は同義語として使用される場合が多く、酸素消費量からエネルギー量への換算は普通、4.8 (cal/O₂ml) を乗じることによって概算が求められる。

3, 小動物の水中での酸素消費量の測定

測定方法の概要

水生動物の標準代謝量を測定するための方法は閉鎖式と開放式の2通りある。閉鎖式は動物を容器に閉じこめ、容器内の酸素濃度の減少量から測定する方法であり、開放式は動物を入れた容器内に一定の流量の水を流し、流入口と流出口の酸素濃度差から呼吸量を求める方法である。閉鎖式は装置が簡便で一度に多くの個体の測定が可能であるが、短期間しか測定できないので、ハンドリングの影響がどうしても入ってくる。一方、開放式では一度に多数の個体を測定することは困難であるが長期間にわたって測定できるので代謝量の日周変化などを明らかにするのに適している。いずれの方法を取るかはどのような動物の呼吸量をどのような目的で測定するかによって異なる。学校での実習のように限られた時間内に測定しなければならない場合には、多数の個体を短期間に測定可能な閉鎖式の測定法が良い。ここでは基本的には閉鎖式であるが、測定直後のハンドリングの影響を小さくするために開放式の要素も取り入れた方法について述べることにする。この方式では二枚貝のように砂の中に潜む動物やシロボヤのように基質に固着する動物の呼吸量を連続測定し、それらの日周変化あるいは潮汐変化を観察することも可能である。

a. 動物

動物としては手軽に入手できる水生動物なら何でもよい。ただし、ここでは動物のサイズと代謝量の関係を求めることを主たる目的として述べることにしているので、一度に様々なサイズの動物を多数採取できる材料として、和歌浦の干潟に生息するコメツキガニとオキシジミガイを用いた場合の例について記する。

b. 測定に必要な器具・薬品

様々なサイズの広口ビンとそれらに合うゴム栓（呼吸室として用いる）、ゴム管、ガラス管（外形5mm程度）、チューブクランプ（医療用のものが軽くて良い）、大型コンテナもしくは水槽、マグネチックスターラー、酸素ビン、プラスチックビーカー（200ml）、ビューレット（10-20ml用）、駒込ピペット（1-2ml）、6 N 塩酸、塩化マンガン、ヨウ化カリ、チオ硫酸ナトリウム、ヨウ素酸カリ、可溶性デンプンなど。

酸素ビン（BOD用ふらんビン）は市販のものでももちろん良いが、結構高価（約2000円/個）な

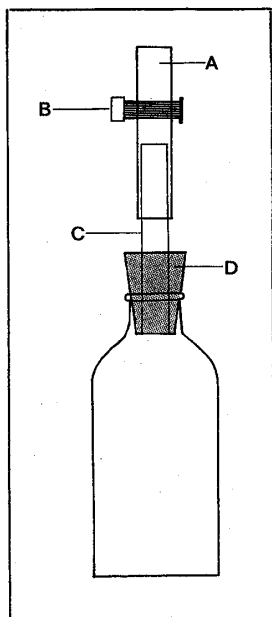


図1 簡単な酸素ビン：A：シリコンチューブ，B：医療用チューブクランプ，C：ガラス管（8－10mm），D：ゴム栓

採水した後，ゴム栓をして，余分の水をAから出し，Bにより空気が入らないように止める。酸素を固定する場合は，Bをはずし，先端を細くした駒込ピペットをビンの中程まで差し入れ，ウィングラー法のAおよびB液をそれぞれ注入する。注入後，空気が入らないようにBで閉じ，ゆっくりと30回ほど回転して試薬がビン全体に回るようにする。その後，沈殿が落ち着くまで水を張った容器にビンを沈めておく。

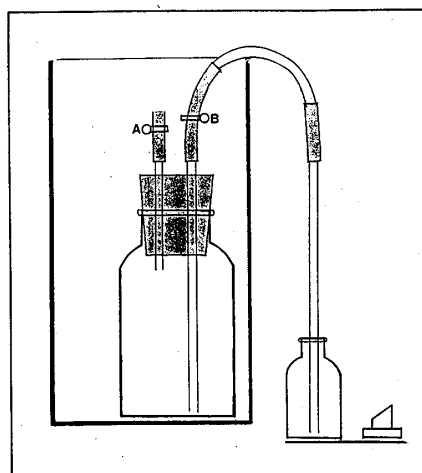


図2 呼吸室の1例：AおよびBはチューブクランプ，

呼吸室に動物を入れ，動物が容器内で落ち着くまでサイホンにより水を流す。動物が落ち着いた後，A及びBを閉じ，密閉する。一定時間の後，ビンを水槽から取り出し，AおよびBを開放して，サイホンにより呼吸室の水を酸素ビンに取る。

ので，100ml程度の容量の細口ビン（ドリンク剤のビンなど）と図1に示したゴム栓およびチューブクランプを組み合わせて，酸素ビンの代用として使用することもできる。ただし，この場合はもちろん作成した酸素ビンの容量をあらかじめ計測しておく必要がある。

c. 測定手順

1) 測定前日に大型のコンテナもしくは水槽に水を張り，充分に通気しておく。

2) 動物の大きさに応じて様々な大きさの広口ビンに動物を入れ，図2に示したようなゴム栓で閉じ，チューブクランプA，Bを開き，動物が落ち着くまでサイホンにより水を流す。オキシジミの場合では，砂（2－3mmメッシュのふるいの上部に残った砂を良く洗ったもの）を呼吸室に入れ，貝が水管を伸ばすまで待つ。

3) 水を流した状態で，図2に示したように酸素ビンを流出口に置き，水を採水する（コントロール）。酸素ビンへの採水は空気との接触をさけるために，図2に示すように酸素ビンの底から水を取り，しばらくオーバーフローさせた後に採水する。また，呼吸室に砂などを入れた場合には，呼吸室に動物を入れないものを用意し，このようにして取ったコントロールと比較する必要がある。

4) コントロールを採水すると直ちにチューブクランプA，Bを閉じ，その時刻を記録する。この様にして密閉した呼吸室は水を張った水槽（水温は呼吸室の水と等しくしておく）に沈める。この際，（3）で採水したコントロールのビンも同様に沈めておく。動物を呼吸室に閉じこめる時間は呼吸室内の酸素濃度がコントロールの70－80%となる時間を目安とする。この時間は呼吸室のサイズや用いる動物のサイズ，水温などによって変化するので，本測定の前に数例の動物を用いてあらかじめ決定しておく。

5) 一定時間後，呼吸室を水槽から取り出し，密閉した状態で呼吸室を数回転倒させ，呼吸室内の水を攪拌した後，呼吸室内の水を酸素ビンに取り，採水した時刻を記録する。採水はチューブクランプA，Bを取り，サイホンで酸素ビンに水を満たす。この場合もしばらくオーバーフローさせてから採水する必要がある。ただし，非常に小さな個体では，動物を直接，酸素ビン内に入

れて呼吸させる。この場合は動物を入れたまま酸素濃度を測定することになる。

6) 固定: (5) で採水した酸素ビンにウィンクラー法の A, B 液を 0.5ml ずつ加えて, 気泡が入らないように密閉し, ビンを 30 回ほど転倒させて内容をよく混合する。その後, 暗所に 2 時間放置する。この際, 同じ日に滴定できない場合には水を満たした容器の底に固定した酸素ビンを沈めて保存することが可能である。

7) 呼吸室の容量 (動物を入れた状態での容量) および動物の体重を測定する。

8) 滴定: 2 時間以上放置した酸素ビンは栓を取って, 沈殿がまき上らないように注意しながら上部の水を少し, 白色ビーカー (200ml のプラスチックビーカー) に取る。その後, 6 N の塩酸 2 ml を酸素ビン内に静かに注入して沈殿物を完全に溶解させ, 内容物を先のビーカーに移す。酸素ビンは蒸留水ですすぎ, すすぎ液もビーカーに入れる。マグネチックスターラーで攪拌しながら規定度既知 (1/100N) のチオ硫酸ナトリウムをビューレットから滴下させて滴定する。黄色が薄くなったらデンプン溶液を数滴加える。更に注意深く滴定を続け, 青色が完全に消えたところを終点とする。滴定は直射日光を避けて行う。滴定後数分経つと液が次第に青みを帯びて来るが考慮しなくて良い。

d. データーの解析

酸素消費量の計算

$$MO_2 = V \times (C_{t_0} - C_t) / (t - t_0)$$

ただし MO_2 : 酸素消費量 ($\mu\text{l/hr}$), V : 呼吸室の容量 (ℓ), C_{t_0} , C_t : コントロールおよび t 時間後の酸素濃度 (ml/ℓ), t_0 , t : 測定開始時刻と終了時刻

このようにして求めたコメツキガニとオキシジミガイの測定結果の例を図 3, 4 に示す。市販のソフトを用いてこれらの値の対数値について回帰直線を求めると, 以下の関係式が得られた。

コメツキガニ

$$MO_2 = 1.156W^{0.711} \quad \text{ただし, } W \text{ はカニの体重 (mg)}$$

回帰係数 勾配: 0.711 ± 0.047 ($n=34$) \pm 標準誤差
y 切片: 0.063 ± 0.1135 ($n=34$) (対数値)

オキシジミガイ

$$MO_2 = 27.348W^{0.326} \quad \text{ただし, } W \text{ は貝の肉質部の重さ (mg)}$$

回帰係数 勾配: 0.326 ± 0.121 ($n=28$) \pm 標準誤差
y 切片: 1.437 ± 0.358 ($n=28$) (対数値)

図 4 のオキシジミガイの結果からもわかるように動物の代謝速度は同じサイズの個体を用いて測定した場合でも大きな変動が見られるのが普通である。この変動は測定誤差によるよりもその個体の生理状態の違いによる個体差である場合が多い。そのために出来るだけ多くの測定を行い, それらのデーターについて統計的な処理を行わないと一定の結論が出せない。

動物の代謝速度は体重の $\frac{3}{4}$ 乗に比例して増加することは良く知られているが, ここで得られたコメツキガニやオキシジミガイの体重に関する指数 0.742 は一般則の指数 0.75 と同じと見なすことができるかどうかは統計処理を行ってはいじめて明らかにすることができる。図 3 に示したコメツキガニの場合では, カニの体重に関して得られた 0.711 と一般則 $\frac{3}{4}$ 乗との間には統計的な有意

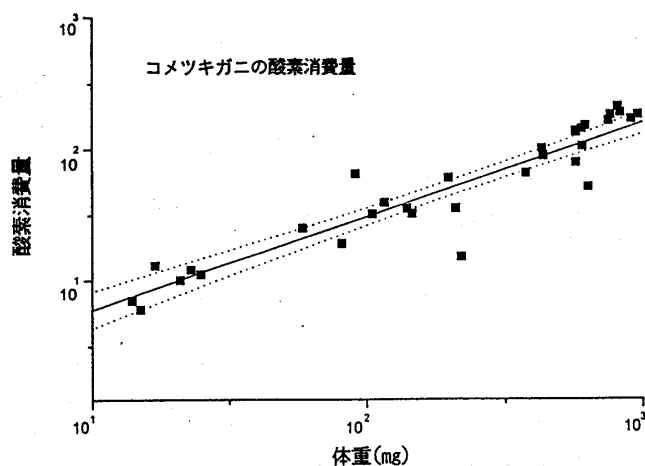


図3 コメツキガニの酸素消費量 ($O_2 \mu l/hr$)と体重(mg)との関係。点線は95%信頼区間を示す。

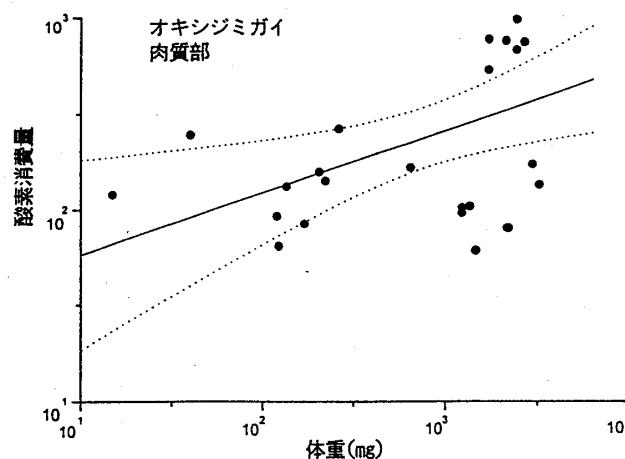


図4 オキシジミガイの酸素消費量 ($O_2 \mu l/hr$)と肉質部の重さ(mg)との関係。点線は95%信頼区間を示す。

差はないが、オキシジミガイの場合では(図4)、一般則から有意に異なっている。オキシジミガイでは水管を長く伸ばす活動的な個体や貝をわずかに開くだけでほとんど水管を伸長しない個体があったので、この様な結果になったものと思われる。この様な場合、一定の結論を得るためにはさらに多くの測定例数が必要となる。

4, 引用・参考文献

- 1) 日本分析化学北海道支部編(1986): 水の分析(第3版), 化学同人
- 2) 気象庁編(1975): 海洋観測指針, 日本気象協会
- 3) 本川達夫(1993): ゾウの時間ネズミの時間, 中公新書